

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 801 592

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

99 14864

⑤1 Int Cl⁷ : C 07 F 9/6593, C 12 N 15/87, A 61 K 48/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.11.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 01.06.01 Bulletin 01/22.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : MAJORAL JEAN PIERRE, MEUNIER
BERNARD, CAMINADE ANNE MARIE, LOUP CHRIS-
TOPHE et ZANTA BOUSSIF MARIA ANTONIETTA.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤4 DENDRIMERES PHOSPHORES ET LEURS APPLICATIONS COMME AGENTS DE TRANSFECTION.

⑤7 Dendrimères phosphorés et leurs applications, com-
me agents de transfection de gènes, in vitro et in vivo, y
compris dans le traitement des maladies humaines et ani-
males. Lesdits agents ou vecteurs sont notamment aptes à
dispenser à des cellules cibles convenables, des séquen-
ces d'acide nucléique d'intérêt.

FR 2 801 592 - A1

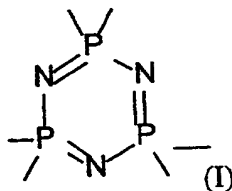


Toutefois, il ressort de la littérature que ces dendrimères phosphorés, non solubles dans l'eau, ne peuvent être utilisés comme agents de transfection.

Dans le cadre de leur recherche, les Inventeurs ont maintenant montré que de nouveaux dendrimères contenant du phosphore, qui sont fonctionnalisés au niveau des couches internes et qui comprennent des amines tertiaires protonées comme terminaisons présentent des propriétés particulièrement intéressantes, en tant que vecteurs de transfert d'acides nucléique.

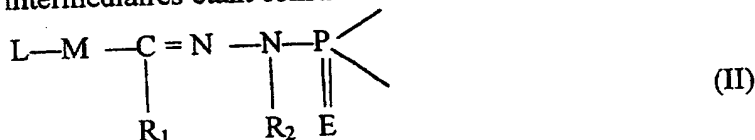
La présente invention a pour objet des dendrimères phosphorés polycationiques, caractérisés en ce qu'ils sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau P_0 comprenant 2 à 8 groupements fonctionnalisés et notamment le groupement de formule générale Ia :



ou le groupement de formule générale Ib : $\text{S}=\text{P}$

- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P1 répondant à la formule II :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore ou de soufre,

M représente l'un des groupes suivants :

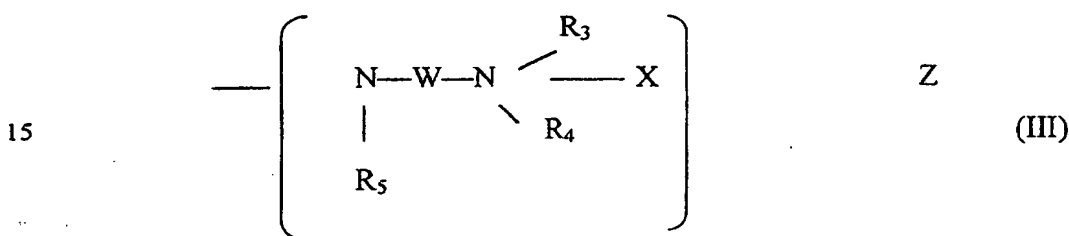
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxys, des groupements insaturés du type oléfinique en $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, azoïque, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
- un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituant tels que définis lorsque M est un groupe aromatique,

R_1 et R_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec R_2 étant le plus souvent différent de R_1 ,

5 n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

10 - une couche externe constituée d'unités P2, identiques ou différentes, et répondant à la formule III :



dans laquelle :

R_5 représente un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants :
20 alkyle, alcoxy, aryle, ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

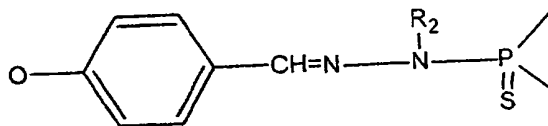
W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

25 R_3 et R_4 qui peuvent être identiques ou différents représentent un groupe en C_1 - C_5 ,

X représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C_1 - C_5 ou est nul et

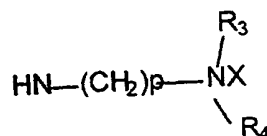
Z représente un ion halogénure, un groupe alkylCOO^- ou tout autre
30 groupement anionique comportant des atomes de carbone, d'oxygène, de soufre, d'azote, de phosphore ou d'halogènes, ou est nul.

Un groupe de formule II préféré est notamment le groupe suivant :



Un groupe de formule III préféré est notamment le groupe suivant :

5



$p = 1 \text{ à } 5$

De tels composés représentent des dendrimères et sont notamment

10 représentés aux figures 1 à 3.

L'expression « alcoxy » désigne les radicaux de formule générale $R'O\cdot$ par exemple, les groupements méthoxy, éthoxy, propoxy, isopropoxy, butoxy, isobutoxy, tertiobutoxy.

15 L'expression "alkyle" désigne les radicaux à chaîne droite ou ramifiée contenant jusqu'à 8 atomes de carbone. Parmi ces radicaux, on peut citer les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, sec-butyle, tert-butyle, pentyle, hexyle.

20 L'expression "aryle" désigne par exemple, un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoyle, alcoyle ou par un atome de chlore, de brome ou de fluor, ou un radical aromatique hétérocyclique à 5 ou 6 chaînons contenant 1 à 2 hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. Parmi ces radicaux aryle, on peut citer les radicaux phényle, (o-, m-, ou p-) méthoxyphényle, (3,4-, 2-6, 2,3-) diméthoxyphényle, (o-, m-, ou p-) tolyle, thiényl, pyridyle.

25 On peut obtenir plusieurs types de produits désignés de manière générale par la formule $A-[G_n]$, dans laquelle A définit le type d'unité terminale et G_n définit le nombre de couches d'unités intermédiaires $P1$ (correspondant au nombre de générations) :

30 - la série des composés $2-[G_n]$ présente des unités terminales de formule III, dans lesquelles X représente un atome d'hydrogène, p est égal à 2, R_3 et R_4 sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est un ion chlorure et n est un nombre entier compris entre 1 et 10 (voir la figure 3) ;

- la série des composés 3-[G_n] présente des unités terminales de formule III, dans lesquelles X est vide, p est égal à 2, R₃ et R₄ sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est vide et n est un nombre entier compris entre 1 et 10 (voir la figure 3) ;

5 - la série des composés 4-[G_n] présente des unités terminales de formule III, dans lesquelles X représente un groupe méthyle, p est égal à 2, R₃ et R₄ sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est un ion iodure et n est un nombre entier compris entre 1 et 10 (voir la figure 3) ;

 - la série des composés 5-[G_n] présente des unités terminales de
10 formule III, dans lesquelles X représente un groupe méthyle, p est égal à 2, R₃ et R₄ sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est un groupe CH₃COO⁻ et n est un nombre entier compris entre 1 et 10 (voir la figure 3).

 - la série des composés 1-[G_n] présente des unités terminales Cl₂ et n est un nombre entier compris entre 1 et 10 (voir la figure 3) (produits intermédiaires
15 pour la préparation des dendrimères selon l'invention).

Les dendrimères phosphorés polycationiques selon l'invention présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux dendrimères de l'art antérieur utilisés comme vecteurs de gènes :

 - ils sont isomoléculaires et sont de ce fait reproductibles (degré de
20 pureté élevé),

 - ils sont chargés, ce qui leur confère une affinité particulière vis-à-vis des acides nucléiques à transférer et donc une bonne qualité de transporteur,

 - ils sont fonctionnalisables aussi bien en surface qu'au niveau des couches internes,

25 - ils sont solubles dans l'eau sans dégradation dans une large gamme de pH (3 à 12) (stabilité en solution aqueuse pendant plusieurs mois). Ceci représente un net avantage par rapport aux dendrimères de type PAMAM qui doivent être dégradés thermiquement (étape peu reproductible) pour donner des composés actifs en transfection,

30 - ils sont peu cytotoxiques (viabilité des cellules transfectées supérieure à 80 %).

Les dendrimères phosphorés selon l'invention peuvent être obtenus, de manière reproductible, par croissance contrôlée de la structure dendrimérique par ajout de couches successives de motifs ou unités $H_2N-N(R_2)-P(S)Cl_2$ de formule VIII.

Le bloc ou noyau central de formule VII (voir figures 1 et 2) correspond à une unité
5 hexachlorocyclotriphosphazène (N_3P_3) modifiée par le triéthylammonium de 4-hydroxybenzaldéhyde de formule VI. Ce noyau qui comprend 6 fonctions aldéhydes terminales est mis en contact avec un diphosphonoalkylhydrazide de formule VIII $H_2N-N(Alk)-P(S)Cl_2$ pour produire un dendron comportant des unités terminales dichlorothiophosphine $P(S)Cl_2$, qui peuvent être mises en contact à nouveau avec un
10 sel de 4-hydroxybenzaldéhyde de formule VI, pour produire par itération chaque génération de dendrimères. Les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, et 5^{ème} générations de dendrimère comprennent respectivement 6, 12, 24, 48 et 96 unités terminales Cl_2 , qui peuvent être traitées avec du N,N-dialkyléthylènediamine, pour produire des dendrimères cationiques après protonation : 2-[G₁] à 2-[G₅], conformément à la figure 3.

15 Ces dendrimères phosphorés polycationiques ont 12, 24, 48, 96 ou 192 charges positives périphériques respectivement pour les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, et 5^{ème} générations de dendrimère.

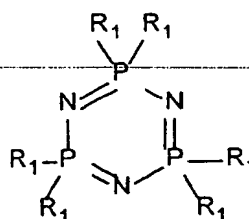
Les formes méthylées (5-[G₁] à 5-[G₅]) sont préparées à partir des amines terminales neutres correspondantes (3-[G₁] à 3-[G₅]) par une méthylation en
20 présence d'iodure de méthyle, suivie d'un échange iodures/acétates à l'aide d'une résine convenable (voir exemple 1).

La pureté et l'intégrité des dendrimères est vérifiées par une analyse spectrale : NMR ¹H, ¹³C et ³¹P.

Seulement 8 à 10 % des branches terminales des dendrimères
25 méthylés (5-[G₁] à 5-[G₅]) présentent un déficit en groupes méthyles.

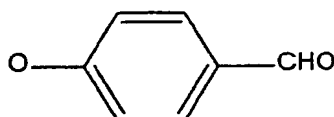
De manière plus précise, les dendrimères selon l'invention peuvent être préparés de la manière suivante :

(1) réaction d'un produit de formule V



(V)

dans lequel R1 représente un groupement comprenant une fonction
5 aldéhyde, de formule VI :



(VI)

pour obtenir un produit de formule VII $N_3P_3(OC_6H_4CHO)_6$ comprenant 6 fonctions aldéhydes (couche centrale constituée d'un noyau P_0 ; figure 3),

10 (2) réaction du produit de formule VII obtenu en (1) avec un diphosphonoalkylhydrazide de formule VIII $H_2N-N(R_2)-P(S)Cl_2$ pour produire un dendron de type 1- $[G_n]$ comportant des unités terminales Cl_2 ,

(3) répétition des étapes (1) et (2) sur le produit obtenu en (2) pour produire un nombre n de couches intermédiaires ; les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, et 5^{ème} générations de dendrimère comprennent respectivement 6, 12, 24, 48 et 96 unités terminales Cl_2 et

15

(4) traitement desdites unités terminales Cl_2 avec du N,N-dialkyléthylènediamine, pour produire des dendrimères cationiques selon l'invention après protonation.

20 La présente invention a également pour objet une composition capable d'agir comme agent de transfection d'une séquence d'acide nucléique vers une cellule eucaryote, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique et un dendrimère phosphoré polycationique tel que défini ci-dessus, opérativement couplé audit acide nucléique.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, le rapport N/P, dans lequel N correspond aux groupes cationiques terminaux du dendrimère (amines chargées) et P correspond aux groupes phosphates dudit acide nucléique, est compris entre 5 et 10.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend en outre un agent de perméabilisation de la membrane capable de transporter ledit acide nucléique à travers les membranes cytoplasmiques ou endosomales de ladite cellule eucaryote.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit dendrimère phosphoré polycationique est associé de manière non-covalente avec ledit acide nucléique.

De manière avantageuse, les dendrimères phosphorés polycationiques selon l'invention, sélectionnés dans la série 2-[G_n] dans laquelle n = 3-5 sont particulièrement intéressants comme vecteurs de transfert d'acide nucléique, alors que les dendrimères de la série 5-[G_n] sont toxiques et relativement inefficaces dans la transfection d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes aussi bien en l'absence qu'en présence de sérum.

Ce phénomène est peut-être lié à une forte densité en charges positives stables, qui peuvent entraîner l'éclatement de la membrane cellulaire et conduire ainsi à une mort de la cellule. La diminution de la densité de charge n'est pas possible pour les produits alkylés sans dégradation des dendrimères, tandis que la densité de charge de la série 2-[G_n] peut être modulée par des modifications micro-environnementales du pH au niveau de la membrane cellulaire. De plus, la possibilité de moduler la densité de charge de cette série de dendrimères peut constituer un facteur clé dans la libération du gène transporté dans les endosomes. Ces dendrimères agissent ainsi peut-être comme un réservoir de protons dans les compartiments cellulaires, leur densité de charge étant contrôlée par les pompes à protons dépendant de l'ATPase et par des modifications de la concentration intracellulaire en chlorures. La possibilité de réduire la densité de charge cationique de ces dendrimères à l'extérieur et à l'intérieur des cellules devrait être favorables pour leur utilisation *in vivo*.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- 5 - la figure 1 illustre la structure du noyau central P_0 (N_3P_3) et un dendrimère selon l'invention de type 3- $[G_2]$;
- la figure 2 illustre un dendrimère selon l'invention de type 2- $[G_4]$;
- la figure 3 illustre un procédé de préparation des dendrimères selon l'invention ;
- 10 - la figure 4 illustre les propriétés de transfert de gène des dendrimères de type 2- $[G_n]$, en présence de sérum (parties droites des figures 4A et 4B) ou en l'absence de sérum (parties gauches des figures 4A et 4B) ;
- la figure 5 illustre les propriétés de transfert de gène des dendrimères de type 5- $[G_n]$, en présence de sérum (parties droites des figures 5A et 5B) ou
- 15 en l'absence de sérum (parties gauches des figures 5A et 5B).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation des dendrimères selon l'invention.

20 Méthodes générales et produits utilisés

Toutes les manipulations ont été réalisées par des techniques courantes dans des conditions sous vide poussé ou sous argon. Les spectres de RMN d' 1H de ^{31}P et de ^{13}C ont été enregistrés par des spectromètres de marque Bruker (AC80, AC200 et AC250). Les déplacements chimiques en RMN du ^{31}P des réactifs

25 sont exprimées en ppm par rapport à 85% de H_3PO_4 . La numérotation utilisée pour la RMN est détaillée sur la figure 1. Les dendrimères 1- $[G_n]$ ont été synthétisés selon les protocoles publiés (16, 17). Dans l'abréviation 1- $[G_n]$, le chiffre 1 correspond à un dendrimère avec des extrémités Cl, 2, 3, 4 ou 5 pour des extrémités $-NH(Et)_2]^+$ (Cl-), $N(Et)_2$, $-NMe(Et)_2]^+$ (I $^-$) ou $-NMe(Et)_2]^+$ (OAc $^-$), respectivement et n correspond au

30 nombre de générations du dendrimère (nombre de couches intermédiaires). L'iodure de méthyle et la N, N-diéthyléthylènediamine ont été fournis par Aldrich et la résine AG1-X8, au fort pouvoir échangeur d'anion, par Biorad.

- Procédures générales pour la synthèse des produits de type 2-[G_n]

De la N, N-diéthyléthylènediamine (n=1, 93 µl, 0,66 mmol ; n=2, 71 µl, 0,5 mmol ; n=3, 68 µl, 0,48 mmol ; n=4, 61 µl, 0,43 mmol, n=5, 60 µl, 0,42 mmol) a été ajoutée goutte à goutte, à la seringue, à une solution contenant
 5 100 mg de dendrimère 1-[G_n] (n=1, 55 µmol ; n=2, 21 µmol ; n=3, 10 µmol ; n=4, 4,5 µmol ; n=5, 2,2 µmol) dans 15 ml de THF distillé (THFΔ), sous forte agitation.
 Après une nuit d'agitation à température ambiante (RT), le solvant a été éliminé par filtration. La poudre blanche a été lavée deux fois avec 20 ml de THF distillé et séchée par évaporation. Les protons produits pendant la réaction de couplage ont été piégés
 10 par les résidus amines tertiaires terminaux, par conséquent les dendrimères 2-[G_n] ont été obtenus sous forme de chlorures.

La première génération de dendrimère 2-[G₁] est obtenue avec un rendement de 80 %. Les données NMR sont les suivantes :

³¹P {¹H} NMR (CD₃OD): δ = 7.9 (P₀), 69.6 (P₁).
 15 ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 1.3 (t, ³J_{HH} = 6.3 Hz, 72 H, CH₂CH₃), 3.0-3.5 (m, 114 H, CH₃-N-P₁, CH₂), 5.7 (br m, 12 H, N-H), 7.1 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 12 H, C₀²-H), 7.9 (s, 6 H, CH=N), 7.9 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 12 H, C₀³-H), 10.8 (br s, 12 H, ⁺N-H).
¹³C {¹H} NMR (CD₃OD): δ = 9.7 (s, CH₂CH₃), 33.3 (d, ²J_{CP1} = 10.3 Hz, CH₃-N-P₁), 37.9 (s, CH₂-N-P₁), 49.5 (s, CH₂CH₃), 53.9 (d, ³J_{CP1} = 6.2 Hz, CH₂-CH₂-N-P₁),
 20 P₁), 122.6 (s, C₀²), 129.8 (s, C₀³), 135.0 (s, C₀⁴), 139.3 (d, ³J_{CP1} = 11.6 Hz, CH=N), 152.4 (d, ²J_{CP0} = 7.3 Hz, C₀¹).
 UV-vis (H₂O): λ_{max} (ε, M⁻¹ x cm⁻¹) 284 nm (1.2 x 10⁵).

Deuxième génération de dendrimère 2-[G₂] (rendement = 95%) :

³¹P {¹H} NMR (CD₃OD): δ = 8.5 (P₀), 62.0 (P₁), 69.6 (P₂).
 25 ¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 1.3 (br s, 144 H, CH₂CH₃), 3.0-3.6 (br m, 246 H, CH₃-N-P_{1,2}, CH₂), 5.6 (br m, 24 H, N-H), 7.0-7.4 (br m, 36 H, C₀²-H, C₁²-H), 7.7-8.2 (m, 54 H, CH=N, C₀³-H, C₁³-H), 10.7 (br s, 24 H, ⁺N-H).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): $\delta = 9.6$ (s, CH_2CH_3), 33.0 (d, $^2J_{\text{CP}2} = 10.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 34.2 (d, $^2J_{\text{CP}1} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 37.8 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_2$), 49.2 (s, CH_2CH_3), 53.9 (d, $^3J_{\text{CP}2} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_2$), 122.8 (s, C_0^2), 123.0 (d, $^3J_{\text{CP}1} = 3.0$ Hz, C_1^2), 129.7 (s, C_1^3), 130.0 (s, C_0^3), 134.3 (s, C_0^4), 135.0 (s, C_1^4), 139.1 (d, $^3J_{\text{CP}2} =$
 5 12.5 Hz, CH=N), 141.3 (d, $^3J_{\text{CP}1} = 15.4$ Hz, CH=N), 152.6 (d, $^2J_{\text{CP}1} = 7.3$ Hz, C_1^1), 152.6 (s, C_0^1).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) 284 nm (3.1×10^5).

Troisième génération de dendrimère 2-[G₃] (rendement = 95%) :

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): $\delta = 8.6$ (P_0), 61.5 (P_1), 62.3 (P_2), 69.5 (P_3).

10 ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1.3$ (br s, 288 H, CH_2CH_3), 3.0-3.5 (br m, 510 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3}$, CH_2), 5.7 (br s, 48 H, N-H), 7.0-7.5 (br m, 84 H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_1^2\text{-H}$, $\text{C}_2^2\text{-H}$), 7.7-8.2 (br m, 126 H, CH=N , $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$, $\text{C}_2^3\text{-H}$), 10.8 (br s, 48 H, $^+\text{N-H}$).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): $\delta = 9.6$ (s, CH_2CH_3), 33.1 (d, $^2J_{\text{CP}3} = 9.4$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_3$), 34.2 (m, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2}$), 37.6 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_3$), 49.2 (s, CH_2CH_3), 53.7 (d, $^3J_{\text{CP}3} =$
 15 6.3 Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_3$), 123.2 (br s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2), 129.6 (br s, C_0^3 , C_1^3 , C_2^3), 134.0 (s, C_0^4 , C_1^4), 134.8 (s, C_2^4), 139.0 (br s, $\text{C}_2^4\text{-CH=N}$), 141.4 (br s, CH=N), 152.4 (d, $^2J_{\text{CP}2} = 7.3$ Hz, C_2^1), 152.8 (br s, C_0^1 , C_1^1).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) 286 nm (7.3×10^5).

Quatrième génération de dendrimère 2-[G₄] (rendement = 95%).

20 ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): $\delta = 8.4$ (P_0), 62.0 ($\text{P}_{1,2,3}$), 69.4 (P_4).

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1.3$ (br s, 576 H, CH_2CH_3), 3.0-3.5 (m, 1038 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3,4}$, CH_2), 5.6 (br s, 96 H, N-H), 7.0-7.5 (br m, 180 H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_1^2\text{-H}$, $\text{C}_2^2\text{-H}$, $\text{C}_3^2\text{-H}$), 7.7-8.2 (m, 270 H, CH=N , $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$, $\text{C}_2^3\text{-H}$, $\text{C}_3^3\text{-H}$), 10.8 (br s, 96 H, $^+\text{N-H}$).

25 ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CD_3OD): $\delta = 9.7$ (s, CH_2CH_3), 33.2 (d, $^2J_{\text{CP}4} = 9.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-}$

P₄), 34.3 (d, $^2J_{CP} = 10.1$ Hz, CH₃-N-P_{1,2,3}), 37.7 (s, CH₂-N-P₄), 49.2 (s, CH₂CH₃), 53.8 (d, $^3J_{CP4} = 5.5$ Hz, CH₂-CH₂-N-P₄), 123.1 (br s, C₀², C₁², C₂², C₃²), 129.7 (br s, C₀³, C₁³, C₂³, C₃³), 134.2 (s, C₀⁴, C₁⁴, C₂⁴), 134.9 (s, C₃⁴), 139.2 (br s, C₃⁴-CH=N), 141.5 (br s, CH=N), 152.5 (d, $^3J_{CP3} = 7.4$ Hz, C₃¹), 153.0 (br s, C₀¹, C₁¹, C₂¹).

UV-vis (H₂O): λ_{\max} (ϵ , M⁻¹ x cm⁻¹) 288 nm (1.7×10^6).

Cinquième génération de dendrimère 2-[G₅] (rendement = 95%).

³¹P {¹H} NMR (CD₃OD): $\delta = 62.0$ (P_{1,2,3,4}), 69.3 (P₅).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): $\delta = 1.3$ (br s, 1152 H, CH₂CH₃), 2.9-3.5 (br m, 2094 H, CH₃-N-P_{1,2,3,4,5}, CH₂), 5.6 (br s, 192 H, N-H), 7.0-7.5 (m, 372 H, C₀²-H, C₁²-H, C₂²-H, C₃²-H, C₄²-H), 7.7-8.2 (m, 558 H, CH=N, C₀³-H, C₁³-H, C₂³-H, C₃³-H, C₄³-H), 10.8 (br s, 192 H, ⁺N-H).

¹³C {¹H} NMR (CD₃OD): $\delta = 9.7$ (s, CH₂CH₃), 33.2 (br s, CH₃-N-P₅), 34.3 (br s, CH₃-N-P_{1,2,3,4}), 37.8 (s, CH₂-N-P₅), 49.2 (s, CH₂CH₃), 53.8 (s, CH₂-CH₂-N-P₅), 123.1 (br s, C₀², C₁², C₂², C₃², C₄²), 129.7 (br s, C₀³, C₁³, C₂³, C₃³, C₄³), 134.2 (s, C₀⁴, C₁⁴, C₂⁴, C₃⁴), 134.9 (s, C₄⁴), 139.2 (br s, C₄⁴-CH=N), 141.5 (br s, CH=N), 152.5 (s, C₄¹), 153.0 (br s, C₀¹, C₁¹, C₂¹, C₃¹).
UV-vis (H₂O): λ_{\max} (ϵ , M⁻¹ x cm⁻¹) 286 nm (3.3×10^6).

- Procédures générales pour la synthèse des produits de type 3-[G_n]

Une solution de soude normale (n=1, 372 m, 0,37 mmol ; n=2, 312 ml, 0,31 mmol ; n=3, 288 ml, 0,29 mmol ; n=4, 288 ml, 0,28 mol ; n=5, 288 ml, 0,28 mmol) a été ajoutée goutte à goutte à une solution contenant 100 mg de dendrimère 2-[G_n] dans 30 ml d'eau distillée (n=1, 31 mmol ; n=2, 13 mol ; n=6, 6 mmol ; n=7, 3 mmol ; n=5, 1,5 mmol), sous agitation forte. Le précipité a été isolé par centrifugation et dissous dans du chloroforme, puis la couche organique a été séchée sur du sulfate de sodium, enfin il a été filtré et séché par évaporation.

Dendrimère 3-[G₁] (rendement = 80%).

³¹P {¹H} NMR (CDCl₃): $\delta = 8.2$ (P₀), 68.3 (P₁).

^1H NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 0.9$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, 72 H, CH_2CH_3), 2.3-2.5 (m, 72 H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$), 2.9 (m, 24 H, $\text{CH}_2\text{-N-P}_1$), 3.1 (d, $^3J_{\text{HP}_1} = 9.4$ Hz, 18 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 4.0 (m, 12 H, N-H), 6.9 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 12 H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7.5 (s, 6 H, CH=N), 7.5 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 12 H, $\text{C}_0^3\text{-H}$).

- 5 ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 11.4$ (s, CH_2CH_3), 30.5 (d, $^2J_{\text{CP}_1} = 10.7$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 38.4 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_1$), 46.3 (s, CH_2CH_3), 52.9 (d, $^3J_{\text{CP}_1} = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_1$), 120.8 (s, C_0^2), 127.3 (s, C_0^3), 132.7 (s, C_0^4), 135.4 (d, $^3J_{\text{CP}_1} = 12.5$ Hz, CH=N), 150.4 (d, $^2J_{\text{CP}_0} = 5.1$ Hz, C_0^1).

Dendrimère 3-[G₂] (rendement = 95%).

- 10 ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 8.4$ (P_0), 62.9 (P_1), 68.1 (P_2).

^1H NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 0.9$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, 144 H, CH_2CH_3), 2.2-2.5 (m, 144 H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.9 (m, 48 H, $\text{CH}_2\text{-N-P}_2$), 3.0 (d, $^3J_{\text{HP}_2} = 9.2$ Hz, 36 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 3.2 (d, $^3J_{\text{HP}_1} = 10$ Hz, 18 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 4.0 (br m, 24 H, N-H), 6.9-7.1 (m, 36 H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_1^2\text{-H}$), 7.4-7.7 (m, 54 H, CH=N , $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$).

- 15 ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 11.4$ (s, CH_2CH_3), 30.6 (d, $^2J_{\text{CP}_2} = 10.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 32.9 (d, $^2J_{\text{CP}_1} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 38.3 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_2$), 46.3 (s, CH_2CH_3), 52.9 (d, $^3J_{\text{CP}_2} = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_2$), 121.1 (s, C_0^2 , C_1^2), 127.4 (s, C_1^3), 128.1 (s, C_0^3), 132.0 (s, C_0^4), 133.1 (s, C_1^4), 135.1 (d, $^3J_{\text{CP}_2} = 12.4$ Hz, CH=N), 138.6 (d, $^3J_{\text{CP}_1} = 15.4$ Hz, CH=N), 150.3 (d, $^2J_{\text{CP}_1} = 7.3$ Hz, C_1^1), 151.1 (s, C_0^1).

- 20 Dendrimère 3-[G₃] (rendement = 95%).

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 8.5$ (P_0), 62.9 ($\text{P}_{1,2}$), 68.1 (P_3).

^1H NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 0.9$ (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 288 H, CH_2CH_3), 2.2-2.5 (br m, 288 H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.9 (br m, 96 H, $\text{CH}_2\text{-N-P}_3$), 3.0 (d, $^3J_{\text{HP}_3} = 9.2$ Hz, 72 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_3$), 3.2-3.4 (br m, 54 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2}$), 4.0 (br s, 48 H, N-H), 6.9-7.3 (br m,

- 25 84 H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_1^2\text{-H}$, $\text{C}_2^2\text{-H}$), 7.4-7.7 (br m, 126 H, CH=N , $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$, $\text{C}_2^3\text{-H}$).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 11.4$ (s, CH_2CH_3), 30.6 (d, $^2J_{\text{CP}3} = 10.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_3$), 32.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.7$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2}$), 38.4 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_3$), 46.4 (s, CH_2CH_3), 53.0 (d, $^3J_{\text{CP}3} = 7.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_3$), 121.4 (s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2), 127.5 (s, C_2^3), 128.2 (s, C_0^3 , C_1^3), 132.0 (s, C_0^4), 132.3 (s, C_1^4), 133.1 (s, C_2^4), 135.2 (d, $^3J_{\text{CP}3} = 12.1$ Hz, CH=N), 138.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12.1$ Hz, CH=N), 150.4 (d, $^2J_{\text{CP}2} = 6.8$ Hz, C_2^1), 151.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C_0^1 , C_1^1).

Dendrimère 3-[G₄] (rendement = 95%).

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 8.4$ (P_0), 62.4 ($\text{P}_{1,2,3}$), 68.0 (P_4).

^1H NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 0.8$ (br s, 576 H, CH_2CH_3), 2.4 (br s, 576 H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.6-3.4 (br m, 462 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3,4}$, $\text{CH}_2\text{-N-P}_4$), 4.0 (br m, 96 H, N-H), 7.0-7.7 (m, 450 H, C_6H_4 , CH=N).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 11.6$ (s, CH_2CH_3), 30.6 (d, $^2J_{\text{CP}4} = 10.4$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_4$), 33.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3}$), 38.5 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_4$), 46.4 (s, CH_2CH_3), 53.1 (d, $^3J_{\text{CP}4} = 7.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_4$), 121.5 (s, C_3^2), 121.8 (s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2), 127.5 (s, C_3^3), 128.3 (s, C_0^3 , C_1^3 , C_2^3), 132.2 (s, C_0^4 , C_1^4 , C_2^4), 133.2 (s, C_3^4), 135.1 (d, $^3J_{\text{CP}4} = 12.0$ Hz, CH=N), 138.7 (br s, CH=N), 150.5 (d, $^2J_{\text{CP}2} = 7.4$ Hz, C_3^1), 151.3 (br m, C_0^1 , C_1^1 , C_2^1).

Dendrimère 3-[G₅] (rendement = 95%).

^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 62.4$ ($\text{P}_{1,2,3,4}$), 68.0 (P_5).

^1H NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 1.0$ (br s, 1152 H, CH_2CH_3), 2.4 (br s, 1152 H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.7-3.5 (br m, 942 H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3,4,5}$, $\text{CH}_2\text{-N-P}_5$), 4.1 (m, 192 H, N-H), 7.0-7.8 (m, 930 H, C_6H_4 , CH=N).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 11.5$ (s, CH_2CH_3), 30.5 (d, $^2J_{\text{CP}5} = 11.1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_5$), 33.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_{1,2,3,4}$), 38.4 (s, $\text{CH}_2\text{-N-P}_5$), 49.4 (s, CH_2CH_3), 53.0 (d, $^3J_{\text{CP}5} = 8.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-P}_5$), 121.4 (s, C_4^2), 121.7 (s, C_0^2 ,

C_1^2, C_2^2, C_3^2), 127.4 (s, C_4^3), 128.1 (s, $C_0^3, C_1^3, C_2^3, C_3^3$), 132.1 (s, $C_0^4, C_1^4, C_2^4, C_3^4$), 133.1 (s, C_4^4), 135.1 (d, $^3J_{CP5} = 12.1$ Hz, CH=N), 138.7 (br s, CH=N), 150.5 (d, $^2J_{CP3} = 6.6$ Hz, C_4^1), 151.2 (d, $^2J_{CP} = 6.2$ Hz, $C_0^1, C_1^1, C_2^1, C_3^1$).

- Procédures générales pour la synthèse des produits de type 4-[G_n]

- 5 Une solution comprenant 100 mg de dendrimères neutres 3-[G_n] (n=1, 36 mmol ; n=2, 15 mmol ; n=3, 7 mmol ; n=4, 3,3 mol ; n=5, 1,6 mmol) et de l'iodure de méthyle (n=1, 27 µl, 0,43 mmol ; n=2, 22 µl, 0,36 mmol ; n=3, 21 µl, 0,34 mmol ; n=4, 20 µl, 0,32 mmol ; n=5, 19 µl, 0,31 mmol) dans 15 ml de DMF a été agitée toute la nuit à température ambiante. La solution a été séchée par évaporation.
- 10 La pâte obtenue a été lavée avec 20 ml d'un mélange pentane/éther (1/1, v/v) pour obtenir une poudre jaune de dendrimères méthylés dénommés 4-[G_n].

Dendrimère 4-[G₁] (rendement = 90%).

^{31}P { ^1H } NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.3 (P₀), 68.1 (P₁).

- ^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.3 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 72 H, CH₂CH₃), 3.1 (s, 36 H, $^+\text{N-CH}_3$), 3.2 (d, $^3J_{\text{HP1}} = 10.4$ Hz, 18 H, CH₃-N-P₁), 3.3-3.7 (br s, 96 H, CH₂), 5.5 (br m, 12 H, N-H), 7.1 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 12 H, C₀²-H), 8.0 (s, 6 H, CH=N), 8.0 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 12 H, C₀³-H).
- 15

- ^{13}C { ^1H } NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.8 (s, CH₂CH₃), 32.6 (d, $^2J_{\text{CP1}} = 9.5$ Hz, CH₃-N-P₁), 34.9 (s, CH₂-N-P₁), 47.3 (s, $^+\text{N-CH}_3$), 56.4 (s, CH₂CH₃), 58.8 (s, CH₂-CH₂-N-P₁), 120.7 (s, C₀²), 128.3 (s, C₀³), 133.2 (s, C₀⁴), 137.4 (d, $^3J_{\text{CP1}} = 14.2$ Hz, CH=N), 149.9 (s, C₀¹).
- 20

Dendrimère 4-[G₂] (rendement quantitatif).

^{31}P { ^1H } NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.3 (P₀), 61.7 (P₁), 68.1 (P₂).

- ^1H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.3 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 144 H, CH₂CH₃), 3.1 (s, 72 H, $^+\text{N-CH}_3$), 3.2-3.6 (m, 246 H, CH₃-N-P_{1,2}, CH₂), 5.7 (br s, 24 H, N-H), 7.0-7.4 (m, 36 H, C₀²-H, C₁²-H), 7.7-8.2 (m, 54 H, CH=N, C₀³-H, C₁³-H).
- 25

^{13}C { ^1H } NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.8 (s, CH₂CH₃), 32.2 (d, $^2J_{\text{CP2}} = 8.9$ Hz, CH₃-N-

P₂), 33.5 (d, $^2J_{CP1} = 12.9$ Hz, CH₃-N-P₁), 34.9 (s, CH₂-N-P₂), 47.3 (s, ⁺N-CH₃), 56.4 (s, CH₂CH₃), 58.8 (d, $^3J_{CP2} = 3.3$ Hz, CH₂-CH₂-N-P₂), 121.3 (s, C₁², C₀²), 128.2 (s, C₁³), 128.6 (s, C₀³), 132.3 (s, C₀⁴), 133.2 (s, C₁⁴), 137.1 (d, $^3J_{CP2} = 12.3$ Hz, CH=N), 140.7 (br s, CH=N), 150.1 (d, $^2J_{CP1} = 6$ Hz, C₁¹), 150.5 (s, C₀¹).

5 Dendrimère 4-[G₃] (rendement quantitatif).

³¹P {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 6.9 (P₀), 61.9 (P_{1,2}), 68.1 (P₃).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.3 (br s, 288 H, CH₂CH₃), 3.1 (s, 144 H, ⁺N-CH₃), 3.1-3.6 (m, 510 H, CH₃-N-P_{1,2,3}, CH₂), 5.5 (br s, 48 H, N-H), 7.0-7.4 (m, 84 H, C₀²-H, C₁²-H, C₂²-H), 7.7-8.2 (m, 126 H, CH=N, C₀³-H, C₁³-H, C₂³-H).

10 ¹³C {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.7 (s, CH₂CH₃), 32.2 (d, $^2J_{CP3} = 9.4$ Hz, CH₃-N-P₃), 33.5 (m, CH₃-N-P_{1,2}), 34.9 (s, CH₂-N-P₃), 47.3 (s, ⁺N-CH₃), 56.4 (s, CH₂CH₃), 58.8 (d, $^3J_{CP3} = 4.8$ Hz, CH₂-CH₂-N-P₃), 121.0 (br s, C₀², C₁², C₂²), 128.5 (br s, C₀³, C₁³, C₂³), 132.3 (s, C₀⁴, C₁⁴), 133.2 (s, C₂⁴), 137.1 (d, $^3J_{CP3} = 12.1$ Hz, CH=N), 141.0 (br s, CH=N), 150.1 (d, $^2J_{CP2} = 6.2$ Hz, C₂¹), 150.7 (br s, C₀¹, C₁¹).

15

Dendrimère 4-[G₄] (rendement quantitatif).

³¹P {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 6.3 (P₀), 61.6 (P_{1,2,3}), 68.0 (P₄).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.3 (br s, 576 H, CH₂CH₃), 3.1 (s, 288 H, ⁺N-CH₃), 3.1-3.6 (m, 1038 H, CH₃-N-P_{1,2,3,4}, CH₂), 5.5 (br s, 96 H, N-H), 7.1-8.5 (m, 450 H, C₆H₄, CH=N).

20

¹³C {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.8 (s, CH₂CH₃), 32.2 (d, $^2J_{CP4} = 9.5$ Hz, CH₃-N-P₄), 33.6 (d, $^2J_{CP} = 7.6$ Hz, CH₃-N-P_{1,2,3}), 34.9 (s, CH₂-N-P₄), 47.3 (s, ⁺N-CH₃), 56.4 (s, CH₂CH₃), 58.7 (d, $^3J_{CP4} = 4.8$ Hz, CH₂-CH₂-N-P₄), 121.2 (br s, C₀², C₁², C₂², C₃²), 128.2 (br s, C₀³, C₁³, C₂³, C₃³), 132.2 (s, C₀⁴, C₁⁴, C₂⁴), 133.2 (s, C₃⁴), 137.1 (d, $^3J_{CP4} = 9.4$ Hz, CH=N), 140.8 (br s, CH=N), 150.0 (d, $^2J_{CP2} = 6.2$

25

Hz, C₃¹), 150.7 (br s, C₀¹, C₁¹, C₂¹).

Dendrimère 4-[G₅] (rendement quantitatif).

³¹P {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 61.6 (P_{1,2,3,4}), 68.0 (P₅).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.3 (br s, 1152 H, CH₂CH₃), 3.1 (s, 576 H, ⁺N-CH₃), 3.1-3.6 (m, 2094 H, CH₃-N-P_{1,2,3,4,5}, CH₂), 5.4 (m, 192 H, N-H), 7.2-8.5 (m, 930 H, C₆H₄, CH=N).

¹³C {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.8 (s, CH₂CH₃), 32.3 (br s, CH₃-N-P₅), 33.5 (br s, CH₃-N-P_{1,2,3,4}), 34.9 (s, CH₂-N-P₅), 47.3 (s, ⁺N-CH₃), 56.4 (s, CH₂CH₃), 58.8 (d, ³J_{CP} = 5.0 Hz, CH₂-CH₂-N-P₅), 121.3 (br s, C₀², C₁², C₂², C₃², C₄²), 128.2 (br s, C₀³, C₁³, C₂³, C₃³, C₄³), 132.2 (s, C₀⁴, C₁⁴, C₂⁴, C₃⁴), 133.2 (s, C₄⁴), 137.2 (d, ³J_{CP4} = 9.7 Hz, CH=N), 141.2 (br s, CH=N), 150.1 (d, ²J_{CP2} = 6.0 Hz, C₄¹), 150.7 (br s, C₀¹, C₁¹, C₂¹, C₃¹).

- Procédures générales pour la synthèse des produits de type 5-[G_n]

La résine à fort pouvoir échangeur d'anions AG1-X8 a été ajoutée à une suspension de 100 mg de dendrimères méthylés 4-[G_n], (sous forme d'iodures), (n=1, 22 µmol ; n=2, 10 µmol ; n=3, 4,7 µmol ; n=4, 21 µmol ; n=5, 1,1 µmol) dans l'eau distillée (n=1, 25 ml ; n=2, 23 ml ; n=3, 22 ml ; n=4, 21 ml ; n=5 ; 20 ml), dans les proportions indiquées (n=1, 1,24 g ; n=2, 1,13 g ; n=3, 1,06 g ; n=4, 1,03 g ; n=5, 1 g) et mélangée doucement pendant une heure. La pâte obtenue a été lavée avec 20 ml d'un mélange pentane/ether (1/1, v/v) pour obtenir une poudre blanche de dendrimères méthylés, sous forme acétate, dénommés 5-[G_n]. 8 à 10 % des ramifications terminales sont modifiées lors de l'échange de contre-ions avec la résine et ont été provisoirement attribués à une forme déméthylée puisque les résultats de RMN étaient identiques à ceux des dendrimères neutres portant des amines tertiaires (3-[G_n], (Ces ramifications terminales mineures ont été indiquées par une astérisque dans les résultats de RMN présentés ci-dessous et les rendements correspondent (n=1, 1,24 g ; n=2, 1,13 g ; n=3, 1,06 g ; n=4, 1,03 g ; n=5, 1 g) à ceux du dendrimère total.

Dendrimère 5-[G₁] (rendement = 90%).

³¹P {¹H} NMR (CD₃OD): δ = 7.8 (P₀), 69.8 (P₁^{*}), 70.3 (P₁).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.0 (t, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 6 H, CH₂CH₃^{*}), 1.3 (t, ³J_{HH} = 6.5 Hz, 66 H, CH₂CH₃), 1.7 (s, 33 H, CH₃COO⁻), 2.5 (m, 6 H, CH₂^{*}-N(CH₂^{*}CH₃)₂), 3.1 (s, 33^{*}H, ⁺N-CH₃^{*}), 3.2 (d, ³J_{HP1} = 8.3 Hz, 18 H, CH₃-N-P₁), 3.3-3.7 (m, 90 H, CH₂), 7.1 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 12 H, C₀²-H), 7.6 (b, 12 H, N-H), 7.8 (s, 6 H, CH=N), 7.8 (d, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 12 H, C₀³-H).

¹³C {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.6 (s, CH₂CH₃), 11.9 (s, CH₂C^{*}H₃), 25.6 (s, CH₃COO⁻), 32.2 (d, ²J_{CP1} = 9.5 Hz, CH₃-N-P₁), 38.8 (s, CH₂-N-P₁), 46.6 (s, C^{*}H₂CH₃), 47.0 (s, ⁺N-CH₃), 54.5 (s, C^{*}H₂-CH₂-N-P₁), 56.2 (s, CH₂CH₃), 59.1 (d, ³J_{CP1} = 5.3 Hz, CH₂-CH₂-N-P₁), 120.6 (s, C₀²), 127.9 (s, C₀³), 133.7 (s, C₀⁴), 135.8 (d, ²J_{CP0} = 10.8 Hz, CH=N), 149.8 (s, C₀¹), 173.7 (s, CH₃COO⁻).

UV-vis (H₂O): λ_{max} (ε, M⁻¹ x cm⁻¹) 284 nm (1.2 x 10⁵).

Dendrimère 5-[G₂] (rendement = 95%).

³¹P {¹H} NMR (CD₃OD): δ = 8.4 (P₀), 62.3 (P₁), 69.5 (P₂^{*}), 70.1 (P₂).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1.0 (br t, 12 H, CH₂CH₃^{*}), 1.3 (br s, 132 H, CH₂CH₃), 1.7 (s, 66 H, CH₃COO⁻), 2.5 (br m, 12 H, CH₂^{*}-N(CH₂^{*}CH₃)₂), 3.1 (s, 66 H, ⁺N-CH₃), 3.2-3.6 (m, 234 H, CH₃-N-P_{1,2}, CH₂), 7.1-7.3 (br m, 36 H, C₀²-H, C₁²-H), 7.6 (br s, 24 H, N-H), 7.7 (s, 12 H, CH=N), 7.8-8.1 (br m, 42 H, CH=N, C₀³-H, C₁³-H).

20 H).

¹³C {¹H} NMR (DMSO-*d*₆): δ = 7.6 (s, CH₂CH₃), 11.9 (s, CH₂C^{*}H₃), 25.6 (s, CH₃COO⁻), 32.1 (d, ²J_{CP2} = 9.3 Hz, CH₃-N-P₂), 33.2 (d, ²J_{CP1} = 13.4 Hz, CH₃-N-P₁), 35.0 (s, CH₂-N-P₂), 46.6 (s, C^{*}H₂CH₃), 47.0 (s, ⁺N-CH₃), 54.5 (s, C^{*}H₂-CH₂-N-P₂), 56.2 (s, CH₂CH₃), 59.1 (d, ³J_{CP2} = 5.3 Hz, CH₂-CH₂-N-P₂), 121.3 (s, C₀², C₁²), 127.9 (s, C₁³), 128.5 (s, C₀³), 132.3 (s, C₀⁴), 133.8 (s, C₁⁴), 135.7 (br s,

CH=N), 149.8 (d, $^2J_{CP1} = 6.5$ Hz, C_1^1), 150.7 (s, C_0^1), 173.7 (s, CH_3COO^-).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$) 284 nm (4.1×10^5).

Dendrimère 5-[G₃] (rendement = 95%).

^{31}P { 1H } NMR (CD_3OD): $\delta = 8.4$ (P_0), 62.3 ($P_{1,2}$), 69.5 (P_3^*), 70.1 (P_3).

1H NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 1.0$ (br t, 30 H, $CH_2CH_3^*$), 1.3 (br s, 258 H, CH_2CH_3),

1.7 (s, 129 H, CH_3COO^-), 2.5 (br m, 30 H, $CH_2^*-N(CH_2^*CH_3)_2$), 3.1 (s, 129 H, $^+N-CH_3$), 3.1-3.6 (m, 480 H, $CH_3-N-P_{1,2,3}$, CH_2), 7.1-7.5 (br m, 108 H, C_0^2-H , C_1^2-H , C_2^2-H , N-H), 7.5-8.1 (br m, 126 H, CH=N, C_0^3-H , C_1^3-H , C_2^3-H).

^{13}C { 1H } NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 7.6$ (s, CH_2CH_3), 11.9 (s, $CH_2C^*H_3$), 25.2 (s, CH_3COO^-), 32.1 (d, $^2J_{CP3} = 9.0$ Hz, CH_3-N-P_3), 33.2 (br m, $CH_3-N-P_{1,2}$), 35.0 (s, CH_2-N-P_3), 46.6 (s, $C^*H_2CH_3$), 47.1 (s, $^+N-CH_3$), 54.5 (s, $C^*H_2-CH_2-N-P_3$), 56.3 (s, CH_2CH_3), 59.1 (d, $^3J_{CP3} = 5.7$ Hz, $CH_2-CH_2-N-P_3$), 121.3 (br s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2), 128.0 (s, C_2^3), 128.5 (s, C_0^3 , C_1^3), 132.4 (s, C_0^4 , C_1^4), 133.8 (s, C_2^4), 136.3 (br d, $C_2^4-CH=N$), 141.0 (br m, CH=N), 150.1 (d, $^2J_{CP2} = 6.3$ Hz, C_2^1), 151.0 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, C_0^1 , C_1^1), 173.7 (s, CH_3COO^-).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$) 286 nm (7.4×10^5).

Dendrimère 5-[G₄] (rendement = 95%).

^{31}P { 1H } NMR (CD_3OD): $\delta = 8.2$ (P_0), 62.2 ($P_{1,2,3}$), 69.9 (P_4).

1H NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 1.0$ (br m, 60 H, $CH_2CH_3^*$), 1.3 (br s, 516 H, CH_2CH_3), 1.7 (s, 258 H, CH_3COO^-), 2.5 (m, 60 H, $CH_2^*-N(CH_2^*CH_3)_2$), 3.1 (s, 258 H, $^+N-CH_3$), 3.1-3.6 (m, 978 H, $CH_3-N-P_{1,2,3,4}$, CH_2), 7.0-8.2 (m, 546 H, C_6H_4 , CH=N, N-H).

^{13}C { 1H } NMR ($DMSO-d_6$): $\delta = 7.6$ (s, CH_2CH_3), 11.9 (s, $CH_2C^*H_3$), 24.7 (s, CH_3COO^-), 32.1 (d, $^2J_{CP4} = 9.6$ Hz, CH_3-N-P_4), 33.2 (d, $^2J_{CP} = 11.2$ Hz, $CH_3-N-P_{1,2,3}$), 35.0 (s, CH_2-N-P_4), 46.6 (s, $C^*H_2CH_3$), 47.0 (s, $^+N-CH_3$), 54.5 (d, $^3J_{CP4} =$

3.9 Hz, $C^*H_2-CH_2-N-P_4$), 56.3 (s, CH_2CH_3), 59.2 (d, $^3J_{CP4} = 5.7$ Hz, $CH_2-CH_2-N-P_4$), 121.2 (s, C_3^2), 121.6 (s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2), 127.9 (s, C_3^3), 128.5 (s, C_0^3 , C_1^3 , C_2^3), 132.3 (s, C_0^4 , C_1^4 , C_2^4), 133.7 (s, C_3^4), 135.8 (br s, $C_3^4-CH=N$), 141.0 (br s, $CH=N$), 149.9 (d, $^2J_{CP3} = 6.3$ Hz, C_3^1), 151.0 (br m, C_0^1 , C_1^1 , C_2^1), 173.7 (s, CH_3COO^-).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$) 288 nm (1.6×10^6).

Dendrimère 5-[G5] (rendement = 95%).

^{31}P { 1H } NMR (DMSO- d_6): $\delta = 62.2$ ($P_{1,2,3,4}$), 69.9 (P_5).

1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 1.0$ (m, 114 H, $CH_2CH_3^*$), 1.3 (m, 1038 H, CH_2CH_3), 1.7 (s, 519 H, CH_3COO^-), 2.5 (m, 114 H, $CH_2^*-N(CH_2^*CH_3)_2$), 3.1 (s, 519 H, $^+N-CH_3$), 3.1-3.6 (m, 1980 H, $CH_3-N-P_{1,2,3,4,5}$, CH_2), 7.0-8.2 (m, 1122 H, C_6H_4 , $CH=N$, $N-H$).

^{13}C { 1H } NMR (DMSO- d_6): $\delta = 7.6$ (s, CH_2CH_3), 11.9 (s, $CH_2C^*H_3$), 24.7 (s, CH_3COO^-), 32.1 (d, $^2J_{CP5} = 9.6$ Hz, CH_3-N-P_5), 33.2 (d, $^2J_{CP} = 11.2$ Hz, $CH_3-N-P_{1,2,3,4}$), 35.0 (s, CH_2-N-P_5), 46.6 (s, $C^*H_2CH_3$), 47.0 (s, $^+N-CH_3$), 54.5 (d, $^3J_{CP5} = 3.9$ Hz, $C^*H_2-CH_2-N-P_5$), 56.3 (s, CH_2CH_3), 59.2 (d, $^3J_{CP5} = 5.7$ Hz, $CH_2-CH_2-N-P_5$), 121.2 (s, C_0^2 , C_1^2 , C_2^2 , C_3^2 , C_4^2), 127.9 (s, C_4^3), 128.5 (s, C_0^3 , C_1^3 , C_2^3 , C_3^3), 132.3 (s, C_0^4 , C_1^4 , C_2^4 , C_3^4), 133.7 (s, C_4^4), 135.9 (br s, $C_4^4-CH=N$), 141.0 (br s, $CH=N$), 149.9 (d, $^2J_{CP3} = 6.5$ Hz, C_4^1), 151.0 (br m, C_0^1 , C_1^1 , C_2^1 , C_3^1), 173.7 (s, CH_3COO^-).

UV-vis (H_2O): λ_{max} (ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$) 284 nm (3.7×10^6).

EXEMPLE 2 : Expériences de transfection.

Les résultats obtenus avec ces différents dendrimères phosphorés polycationiques ont toujours montré une efficacité optimale avec un rapport de charges N/P compris entre 5 (figure 4) et 10 (figure 5) (rapport N/P=nombre d'atomes d'azote terminaux du dendrimère par phosphate de l'ADN). Ainsi, il a été décidé de

façon arbitraire de comparer l'efficacité de transfection de différentes générations de dendrimères phosphorés (P-dendrimères) avec celle du PEI linéaire ExGen 500, possédant 5 à 10 équivalents amines par nucléotide.

Avec 5 équivalents de charges positives par phosphate de l'ADN, les
5 5 différentes générations de dendrimères protonés de type 2-[G_n], testés sous forme de chlorures, ont permis d'obtenir une expression significative du transgène. Une augmentation de 10⁵ à presque 10⁹ unités relatives de luminescence (RLU)/mg de protéine a été observée. L'efficacité de transfection augmente avec la taille du dendrimère (nombre de génération) mais atteint un plateau à partir de la troisième
10 génération, avec des valeurs comprises entre 10⁸ et 10⁹ RLU (Fig. 4). Par conséquent, 2-[G₄] a été choisi pour étudier plus en détail, l'efficacité de transfection de ces nouveaux dendrimères cationiques phosphorés, dont la structure est présentée sur la figure 2.

Il faut remarquer que les transfections effectuées en présence de
15 sérum conduisent à une plus faible toxicité. De ce fait un niveau d'expression plus élevé est observé pour les transfections effectuées en présence de sérum par rapport à celles effectuées sans sérum (Fig. 4A et 4B), panneaux droits et gauches, respectivement).

Sans essayer d'optimiser davantage leurs conditions de transfection,
20 les dendrimères de la troisième à la cinquième génération se sont révélés aussi efficaces que le PEI linéaire utilisé en conditions optimales.

En revanche, les formes méthylées 5-[G_n] se sont montrées plutôt toxiques et peu efficaces pour transférer des acides nucléiques dans des cellules eucaryotes (Fig 5A et 5B). Ce phénomène peut s'expliquer du fait d'une densité de charge
25 positive stable qui peut perturber la membrane cellulaire et provoquer la mort cellulaire. La diminution de la densité de charge des formes méthylées n'est pas réalisable sans dégrader le dendrimère, en revanche la densité de charge des dérivés chlorures (2-[G_n]) peut être modulée par des modifications micro-environnementales du pH lorsqu'ils approchent la membrane cellulaire. De plus, la possibilité de moduler la
30 densité de charge des dérivés chlorures des dendrimères joue peut-être un rôle clé dans le relargage du gène luciférase à partir de l'endosome. Ces dendrimères se comportent peut-être comme des réservoirs à proton dans les compartiments cellu-

lares, leur densité de charge étant contrôlée d'une part par des pompes à protons couplées à des ATPases et d'autre part par des modifications intracellulaires de la concentration en chlorures. La possibilité de réduire la densité de charge cationique de ces dendrimères phosphorés, à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, serait un avantage pour la réalisation d'expériences *in vivo*, comme cité précédemment (26).

- Produits chimiques

Le PEI linéaire de 22 kDa (ExGen 500) a été fourni par Euromedex (Souffelweyersheim, France).

- Lignées et culture cellulaires.

Les fibroblastes murins NIH3T proviennent de l'ATCC (Rockville, MA, USA) et sont cultivés en milieu Dulbecco modifié par Eagle (DMEM). Les milieux de culture sont supplémentés avec 10 % de sérum de veau fœtal (D. Dutscher, Brunath, France), 2 mM L-glutamine (Gibco-BRL), 100 unités/ml de pénicilline (Gibco-BRL) et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco-BRL). Les cellules sont maintenues à 37°C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont décollées par une solution saline de trypsine-EDTA (Gibco-BRL), diluées d'un facteur dix et cultivées dans un nouveau flacon.

- Plasmides

PCMV-luc, codant pour la luciférase de *Photinus pyralis*, sous le contrôle des séquences promoteur/enhanceur du cytomégalo virus ont été gracieusement fournies par le Dr. M. Scarpa (CRIBI, padoue, Italie). Les plasmides ont été purifiés sur des colonnes Qiagen (Rockford, USA), à partir de la souche XL1 d'*E. Coli* transformée.

- Transfection des cellules

Les cellules adhérentes ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits (Costar, D. Dutscher, France), la veille de la transfection, de façon à atteindre 60 à 70 % de confluence, le jour de la transfection. Toutes les expériences ont été faites en triple. Les cellules ont été rincées avant la transfection et 1 ml de milieu avec ou sans sérum a été ajouté dans chaque puits. 2 µg de plasmide (solution à 1,5 mg/ml en tampon 10 mM Tris-1 mM EDTA, pH 7,4) ont été dilués dans 50 µl de NaCl 0,15 M.

Le rapport N/P (azote:phosphate) correspond à la quantité de polymère nécessaire pour avoir un résidu amine (43Da=poids moléculaire moyen (M_w))

pour le PEI ; pour les dendrimères la molarité en azote des résidus amine a été calculée en divisant le M_w par le nombre de charges pour chaque génération), par phosphate d'acide nucléique ($M_w 330$), (12). La quantité nécessaire de PEI linéaire (ExGen500) et de dendrimères (à partir de solutions stock de PEI et de dendrimères

5 correspondant à 10 mM d'azote, sous forme amine, dans l'eau MilliQ stérile) a été diluée dans 50 μ l de NaCl 0,45 M, vortexée doucement et centrifugée. Après 15 min, le vecteur cationique a été ajouté en une seule fois, à la solution de plasmide [et pas dans l'ordre inverse, (12)] puis le mélange a été vortexé et centrifugé. Les quantités et les volumes indiqués ci-dessus correspondent à un puits et ont en fait été multipliés

10 par trois et distribués dans trois puits. Après 10 min, le mélange a été ajouté sur les cellules et le surnageant a été réparti de façon homogène par une légère rotation manuelle horizontale. Tout de suite après, la plaque de culture a été centrifugée (Sigma 3K10, Bioblok, France), pendant 5 min à 1500 rpm (280 g). Après 2 à 3 heures d'incubation, 110 μ l de sérum de veau foetal a été ajouté aux puits sans sérum.

15 Les cellules ont été cultivées pendant 24 h puis l'expression du gène rapporteur a été testée.

- Mesure de la luciférase

L'expression du gène luciférase a été mesurée par luminescence. Le milieu de culture a été enlevé et le lysat cellulaire a été récolté après incubation de 30

20 min à température ambiante dans le tampon de lyse 1x (Promega, USA). Le lysat a été vortexé doucement et centrifugé à 140000 rpm (17530 g), pendant 5 min, à 4°C. 20 μ l de lysat ont été dilués dans 100 μ l de tampon de réaction luciférase (Proméga, USA) et la luminescence a été mesurée pendant 10 sec. (Mediators PhL, Vienne, Autriche). Les résultats ont été exprimés en unité de luminescence par mg de protéine (mesuré

25 par le test BCA, Pierce).

EXEMPLE 3 : Pourcentages de viabilité des cellules transfectées conformément à l'exemple 2.

Dendrimères-N ⁺ Et ₂ H, Cl ⁻			Dendrimères-N ⁺ Et ₂ Me, CH ₃ CO ₂ ⁻		
	5 équivalents	10 équivalents		5 équivalents	10 équivalents
G ₁	95	105	G ₁	90	88
G ₂	91	83	G ₂	91	101
G ₃	83	90	G ₃	87	99
G ₄	94	91	G ₄	99	95
G ₅	90	80	G ₅	108	92

PE1 linéaire : 5 équivalents : 69 ; 10 équivalents : 84

5 PE1 réticulé : 5 équivalents : 102 ; 10 équivalents : 91

RÉFÉRENCES

- [1] A. D. Miller, *Nature* **1992**, 357, 455-460.
- [2] J. M. Wilson, *New Engl. J. Med.* **1996**, 334, 1185-1187.
- 10 [3] P. Briand, A. Kahn, *Path. Biol.* **1993**, 41, 663-671.
- [4] B. Y. Roessler, J. W. Hartman, D. K. Vallance, Y. M. Latta, J. L. Janich, B. L. Davidson, *Hum. Gene. Ther.* **1995**, 6, 307-316.
- [5] C. J. Wheeler, J. H. Felgner, Y. J. Tsai, J. Marshal, L. Sukhu, S. G. Doh, J. Hartikka, J. Nietsupski, M. Manthorpe, M. Nichols, M. Plewe, X. Liang, J. Norman, A. Smith, S. H. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11454-11459.
- 15 [6] J. P. Behr, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 382-389.
- [7] J. P. Vigneron, N. Oudrhiri, M. Fauquet, L. Vergely, J. C. Bradley, M. Bassville, P. Lehn, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9682-9686.
- 20 [8] G. Byk, C. Dubertret, V. Escriou, M. Frederic, G. Jaslin, R. Rangara, B. Pitard, J. Crouzet, P. Wils, B. Schwartz, D. Scherman, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 224-235.
- [9] A. W. Miller, *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1768-1785.
- [10] T. Hara, Y. Tan, L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 14547-14552.
- 25 [11] I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, C. R. Safinya *Science* **1998**, 281, 78-81.
- [12] O. Boussif, M. A. Zanta, A. Adib, J. P. Behr, *Gene Ther.* **1996**, 3, 1074-1080.
- [13] J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 372-379.
- [14] A. Bielinska, J. F. Kukowska-Latallo, J. Johnson, D. A. Tomalia, J. R. Baker,

Nucleic Acids Res. 1996, 24, 2176-2182.

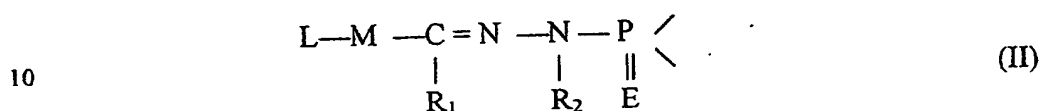
- [15] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 703-714.
- [16] N. Launay, A. M. Caminade, R. Lahana, J. P. Majoral, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 1589-1592.
- [17] N. Launay, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 3282-3283.
- [18] C. Galliot, C. Larré, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *Science* 1997, 277, 1981-1984.
- [19] C. Larré, B. Donnadiou, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4029-4030.
- [20] D. A. Tomalia, H. D. Durst, *Topics Curr. Chem.* 1993, 165, 193-313.
- [21] F. Zeng, S. C. Zimmerman, *Chem. Rev.* 1997, 97, 1681-1712.
- [22] K. W. Pollak, J. W. Leon, J. M. J. Fréchet, M. Maskus, H. D. Abruna, *Chem. Mater.* 1998, 10, 30-38.
- [23] E. Wagner, M. Cotten, R. Foisner, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 4255-4259.
- [24] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 7934-7938.
- [25] J. F. Kukowska-Latallo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 4897-4902.
- [26] J. S. Remy, A. Kichler, V. Mordinov, F. Schuber, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 1744-1748.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Dendrimères phosphorés polycationiques, caractérisés en ce qu'ils sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau central P_0 comprenant 2 à 8 groupements fonctionnalisés,
- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P_1 répondant à la formule II :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore ou de soufre,

M représente l'un des groupes suivants :

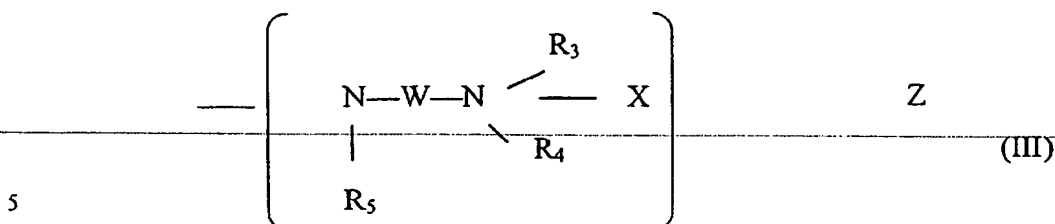
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxys, des groupements insaturés du type oléfinique en C_1 - C_{12} , azoïque, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
- un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituant tels que définis lorsque **M** est un groupe aromatique,

R₁ et **R₂**, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec **R₂** étant le plus souvent différent de **R₁**,

n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

- une couche externe constituée d'unités P_2 , identiques ou différentes, et répondant à la formule III :



dans laquelle :

R_5 représente un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

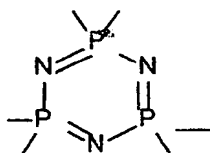
W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes.

R_3 et R_4 qui peuvent être identiques ou différents représentent un groupe en $\text{C}_1\text{-C}_5$,

X représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_5$ ou est nul et

Z représente un ion halogénure, un groupe alkylCOO^- ou tout autre groupement anionique comportant des atomes de carbone, d'oxygène, de soufre, d'azote, de phosphore ou d'halogènes, ou est nul.

2°) Dendrimères selon la revendication 1, caractérisés en ce que le noyau central P_0 est sélectionné dans le groupe constitué par le groupement de formule générale Ia :



(I)

ou le groupement de formule générale Ib : $\text{S}=\text{P}$ (with two generic bonds)

3°) Dendrimères selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils présentent des unités terminales de formule III, dans lesquelles X représente un atome d'hydrogène, R_5 est un atome d'hydrogène, W

représente un groupe $(CH_2)_2$, R_3 et R_4 sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est un ion chlorure et n est un nombre entier compris entre 1 et 11.

4°) Dendrimères selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils présentent des unités terminales de formule III, dans
5 lesquelles X représente un groupe méthyle, R_5 est un atome d'hydrogène, W représente un groupe $(CH_2)_2$, R_3 et R_4 sont identiques et représentent des groupes éthyle, Z est un groupe CH_3COO^- et n est un nombre entier compris entre 1 et 11.

5°) Composition capable d'agir comme agent de transfection d'une séquence d'acide nucléique vers une cellule eucaryote, caractérisée en ce qu'elle
10 comprend un acide nucléique et un dendrimère phosphoré polycationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, opérativement couplé audit acide nucléique.

6°) Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

7°) Composition selon la revendication 5 ou la revendication 6,
15 caractérisée en ce que le rapport N/P, dans lequel N correspond aux groupes cationiques terminaux du dendrimère (amines chargées) et P correspond aux groupes phosphates dudit acide nucléique, est compris entre 5 et 10.

8°) Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un agent de perméabilisation de la
20 membrane capable de transporter ledit acide nucléique à travers les membranes cytoplasmiques ou endosomales de ladite cellule eucaryote.

9°) Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que ledit dendrimère phosphoré polycationique est associé de manière non-covalente avec ledit acide nucléique.

1/5

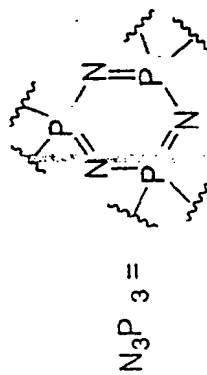
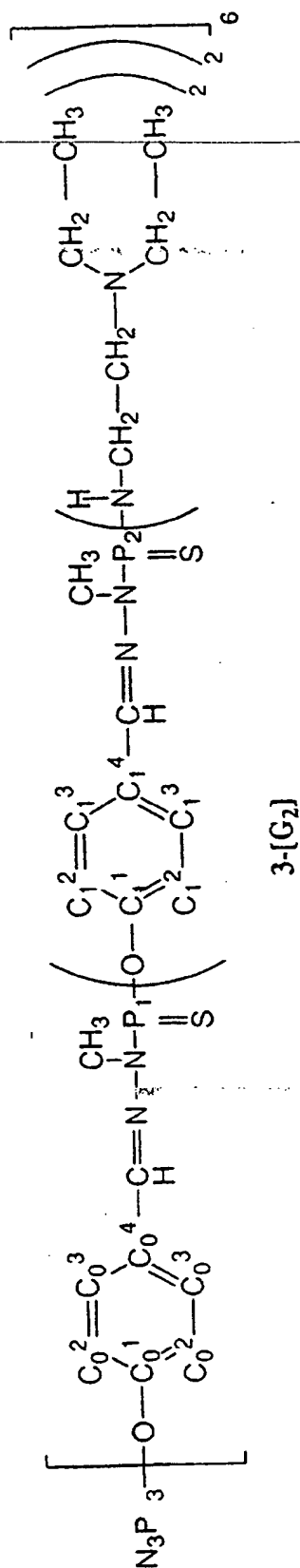


FIGURE 1

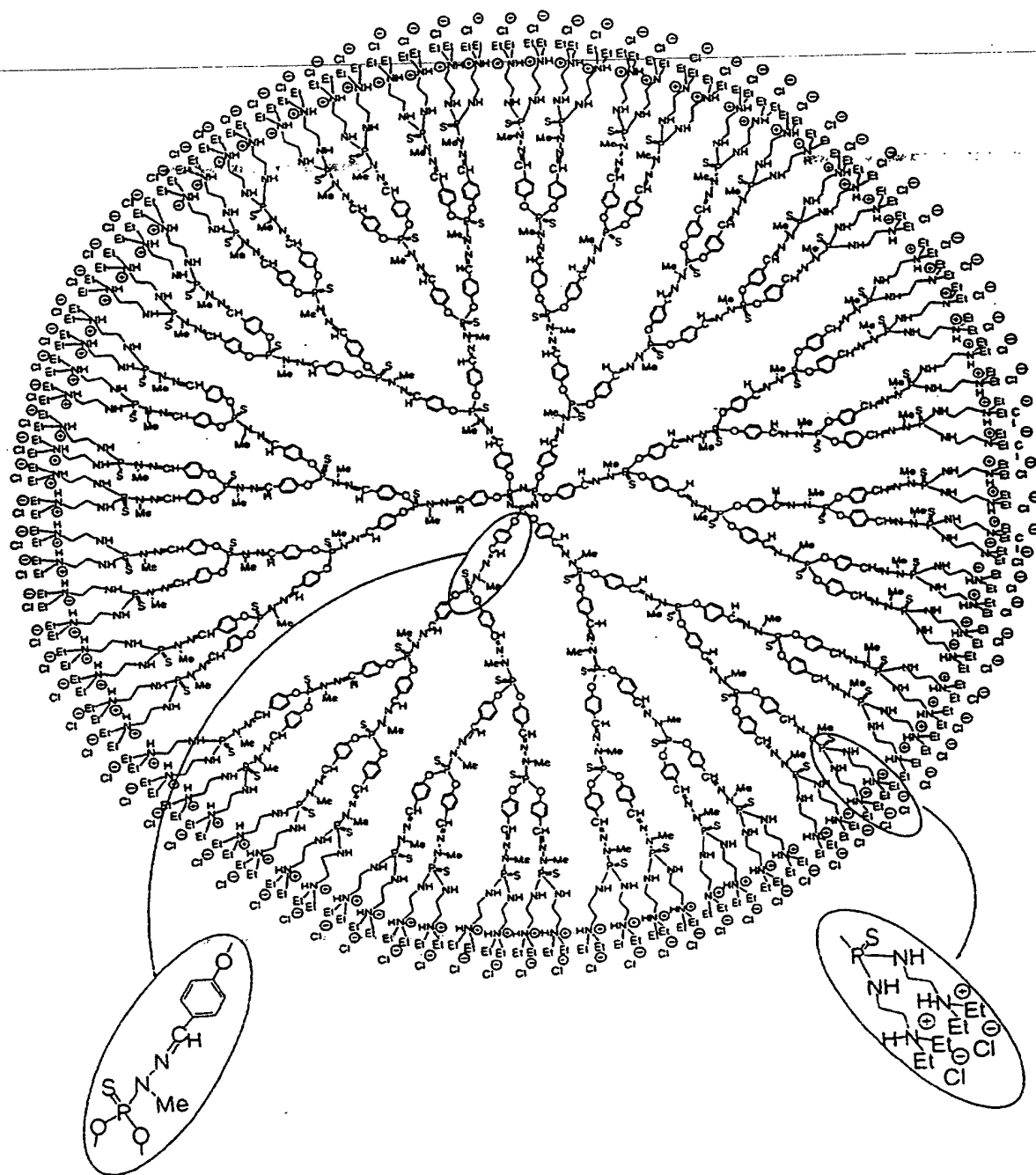


FIGURE 2

3/5

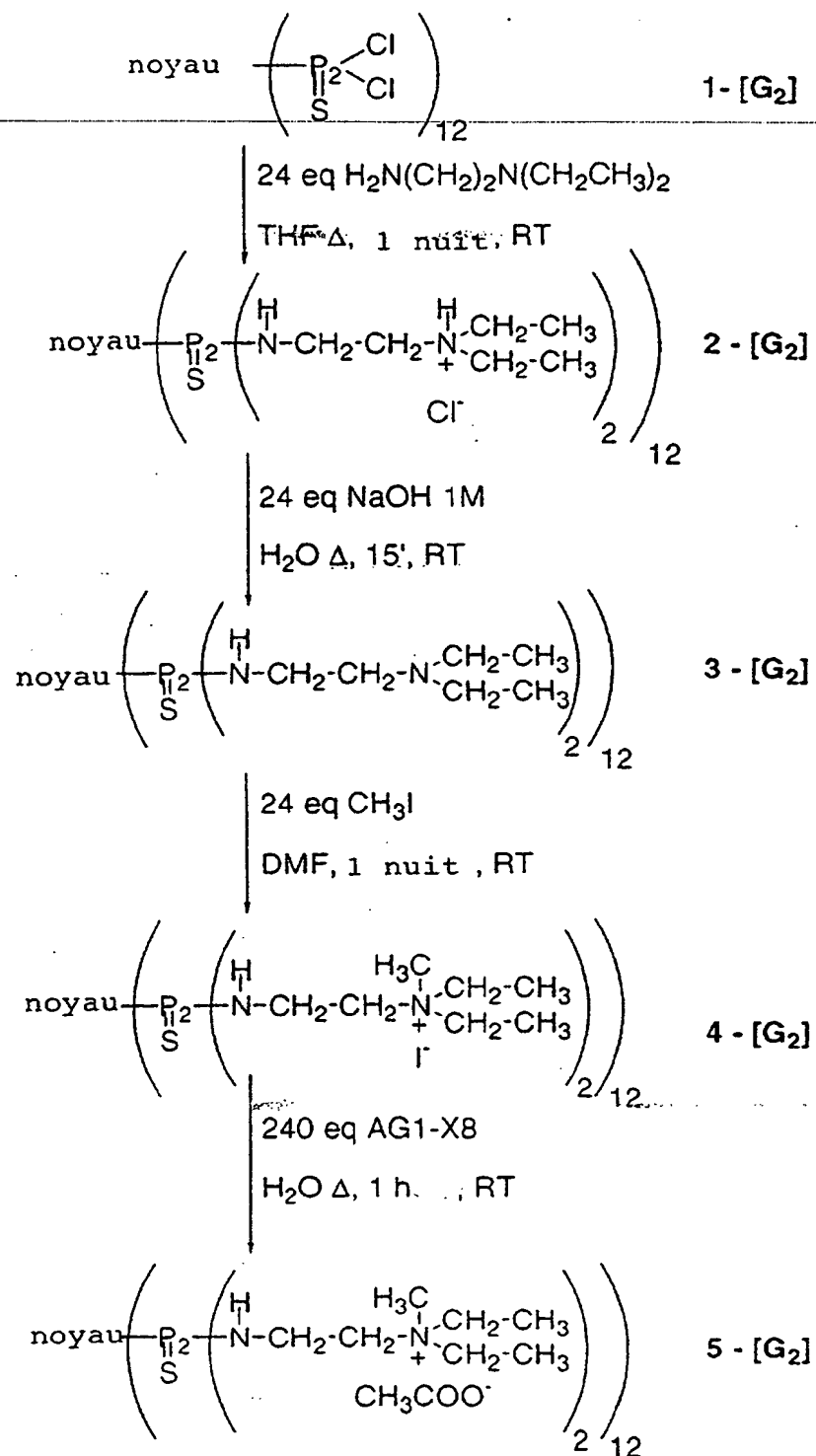


FIGURE 3

4/5

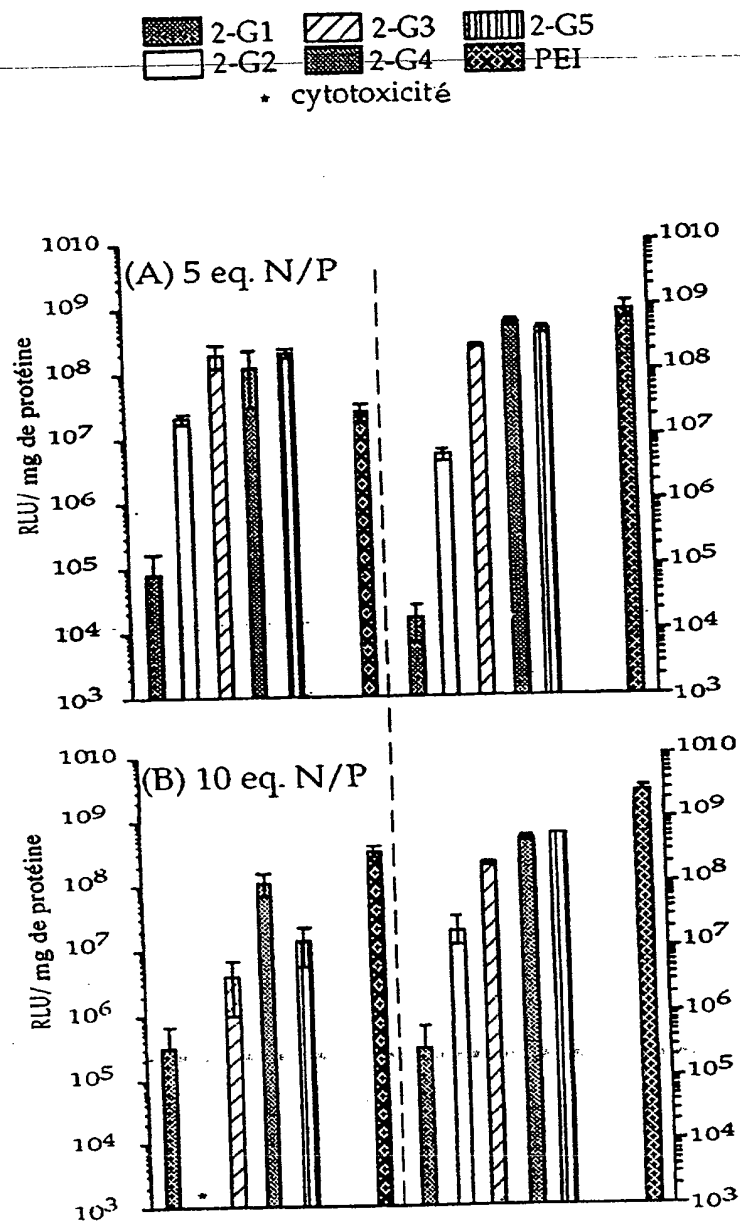


FIGURE 4

5/5

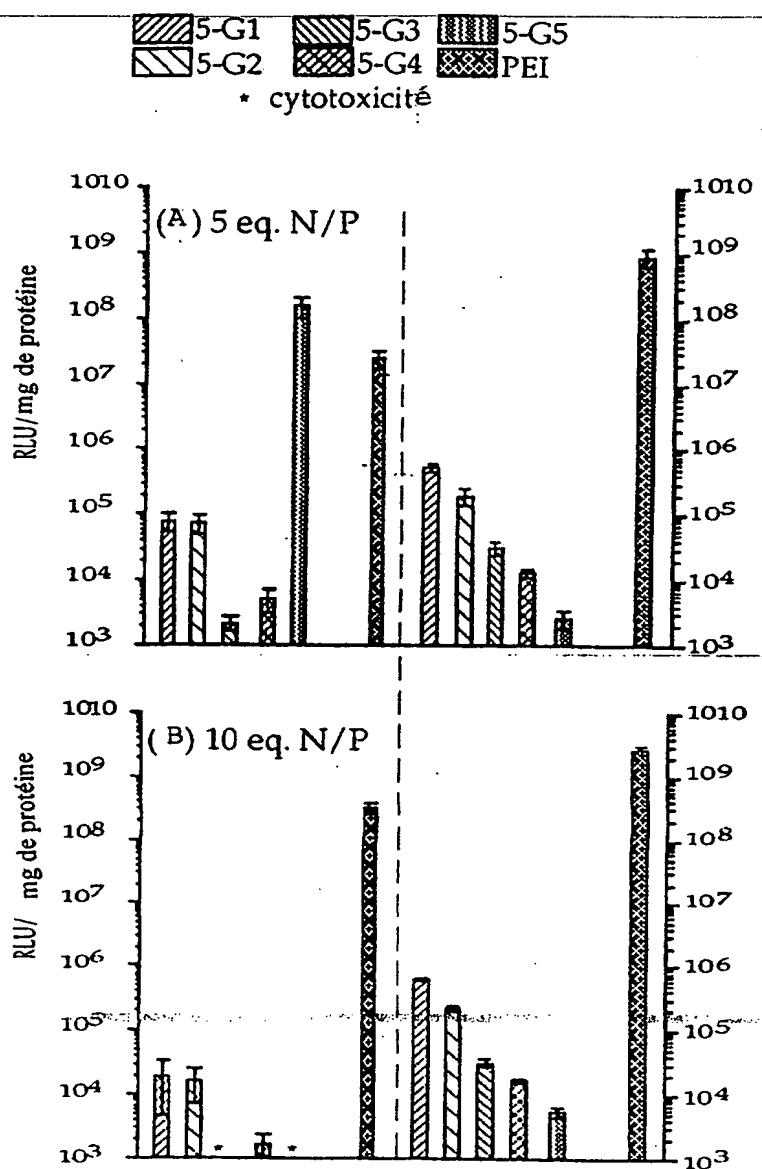


FIGURE 5



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2801592

N° d'enregistrement
nationalFA 581053
FR 9914864

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	GALLIOT C.: "Regioselective stepwise growth of dendrimer units in the internal voids of a main dendrimer" SCIENCE., vol. 277, 26 septembre 1997 (1997-09-26), pages 1981-1984, XP000929654 AAAS. LANCASTER, PA., US * le document en entier *	1-4	C07F9/659 C12N15/87 A61K48/00
D,A	LARRÉ C.: "Phosphorus-containing dendrimers: chemoselective functionalization of internal layers" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., vol. 120, no. 16, 29 avril 1998 (1998-04-29), pages 4029-4030, XP002144558 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC., US ISSN: 0002-7863 * le document en entier *	1-4	
A	PRÉVOTÉ D.: "Phosphate-, phosphite-, ylide-, and phosphonate-terminated dendrimers" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY., vol. 62, no. 14, 11 juillet 1997 (1997-07-11), pages 4834-4841, XP002144559 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US ISSN: 0022-3263 * le document en entier *	1-4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C07F C12N
A	WO 95 02397 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 26 janvier 1995 (1995-01-26) * le document en entier *	1,5-9	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 août 2000		Beslier, L	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 (2.99) (P4/C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2801592

N° d'enregistrement
nationalFA 581053
FR 9914864

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	LOUP C.: "Preparation of water-soluble cationic phosphorus-containing dendrimers as DNA transfecting agents" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL., vol. 5, no. 12, décembre 1999 (1999-12), pages 3644-3650, XP002144560 VCH PUBLISHERS., US ISSN: 0947-6539 * le document en entier *	1-9	
T	MARAVAL V.: "Rapid synthesis of phosphorus-containing dendrimers with controlled molecular architectures: first example of surface-block, layer-block, and segment-block dendrimers issued from the same dendron" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., vol. 122, no. 11, 22 mars 2000 (2000-03-22), pages 2499-2511, XP002144561 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC., US ISSN: 0002-7863 * le document en entier *	1-4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 août 2000		Beslier, L	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P/MC14)

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page blank (uspto)